

( 9 )

特開昭63-087984

⑨ 日本国特許庁(JP) ⑩ 特許出願公開  
⑪ 公開特許公報(A) 昭63-87984

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和63年(1988)4月19日  
C 12 N 15/00 A-8412-4B  
C 07 K 13/00 8318-4H  
15/12 8318-4H※ 審査請求 有 発明の数 7 (全13頁)

⑭ 発明の名称 ヒトのインター-α-トリプシン阻害剤の遺伝子

⑮ 特 願 昭62-186767

⑯ 出 願 昭62(1987)7月28日

優先権主張 ⑰ 1986年7月29日 ⑱ 米国(U S) ⑲ 891469

⑳ 発 明 者 ジョン・フレデリック アメリカ合衆国インディアナ州46545ミシヤワカ・ユニバ  
ク・カウマイヤー ーシティパークドライブ 5501エイ

㉑ 発 明 者 マイケル・ポール・コ アメリカ合衆国インディアナ州46514エルクハート・オー  
ティツク ルドミルドライブ 54231

㉒ 出 願 人 マイルス・ラボラトリ アメリカ合衆国インディアナ州46515エルクハート・マー  
ース・インコーポレー トルストリート1127・ビーオーボックス40  
テツド

㉓ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ヒトのインター-α-トリプシン阻害剤の  
遺伝子

2. 特許請求の範囲

1. インター-α-トリプシン阻害剤の軽鎖のH  
I-30 領域領域をもつ配列中のα-1-ミクロ  
グロブリンを暗号化することを特徴とするcDN  
A配列。

2. 前記cDNA配列に対して分断先導配列  
5' の遺伝情報を指定するDNA配列をさらに含  
む特許請求の範囲第1項記載のcDNA配列。

3. 特許請求の範囲第1項記載のcDNA配列  
を含んでなることを特徴とする組換えDNAク  
ローニングベクター。

4. 特許請求の範囲第2項記載のcDNA配列  
を含んでなることを特徴とする組換えDNAク  
ローニングベクター。

5. 特許請求の範囲第3項記載のクローニング

ベクターによって形質転換された微生物。

6. 特許請求の範囲第4項記載のクローニング

ベクターによって形質転換された微生物。

7. α-1-ミクログロブリンおよびHI-3  
0を含んでなることを特徴とするインター-α-ト  
リプシン阻害剤の軽鎖の融合蛋白質。

3. 発明の詳細な説明

インター-α-トリプシン阻害剤(inter-  
alpha-trypsin inhibitor) (ITI) は、ヒトの血液および血清中に見  
出されるセリンプロテアーゼ阻害剤である。この  
蛋白質は、蛋白質分解酵素、トリプシン、キモト  
リプシンおよび好中性(neutrophil)  
エラスターゼを阻害することが報告されている。  
しかしながら、阻害剤の特異的ターゲットは未知  
である。ITIは1より多い分子量の種として存  
在するということにおいて、血漿プロテイナーゼ  
阻害剤類のうちで独特ある。それは180キログ  
ルトン(kd)程度に高い分子量の形態でありか

## 特開昭63-87984(2)

つ30kd程度に低い分子量の種であることが発見された。この低分子量の種はHI-30と表示された。HI-30はトリプシンで処理することによって高分子量の形態から解放されうる。HI-30の断片は、高分子量の形態の抗蛋白質分解活性のすべてを含有する。しかしながら、180kdの蛋白質の前駆体は、血漿中に見出されるHI-30蛋白質の前駆体であることが直接立証されてきていない。HI-30は180kdの形態から独立に生産されることが可能である。

高分子量のITIの全体の構造は未知である。しかしながら、分解生成物、HI-30、はヒト尿から精製され、そして完全なアミノ酸配列は決定された。HI-30は50%の炭水化物から構成されており、そして2つの直列に連結した(random linked)抗蛋白質分解活性ドメイン(domain)を含有する。両者のドメインは低分子量のセリンプロテアーゼ阻害剤のクニツ(Kunitz)族に構造的に関係する。

30kDa領域を含有するITI軽鎖のための遺伝子のcDNAコピーは、ヒト肝臓mRNAライブラリーから分離された。最長のクローン(コロニーのハイブリダイゼーションによって同定された)の全ヌクレオチド配列は決定された。これによって、HI-30のための遺伝子は遺伝子の3'末端に存在し、これは蛋白質のカルボキシ末端に相当することが確認された。アミノ酸構造(これはヌクレオチド配列から遺伝暗号の転写によって誘導される)は、一般に、前に報告されたHI-30蛋白質配列から入手できるデータと一致する。しかしながら、HI-30のためのこの構造遺伝子に対して5'は、血清蛋白質、 $\alpha$ -1-ミクログロブリンを暗号化するオープンリーディングフレーム(open reading frame)であることが、今回、発見された。 $\alpha$ -1-ミクログロブリンは、また、蛋白質HCとして知られている。 $\alpha$ -1-ミクログロブリンは、血漿、尿および脳脊髄液中に見出される31

180kdのITIは一本鎖の糖蛋白質として記載されてきたが、最近の実験は、ITIを構成するポリヌクレオチドの遺伝情報を指定する多数のメッセンジャーRNA(mRNA)がヒト肝臓中に存在することを示している。これらのmRNAの1つは、ITI軽鎖(light chain)と呼ばれる42kdの蛋白質の遺伝情報を指定する。この蛋白質はHI-30に対して特異的な抗体と反応する。プーアグニオン(Bourguignon)ら、1983参照。ITIの軽鎖の相補的DNA(cDNA)クローンは、ヒト肝臓mRNAライブラリーから他のものによって分離され、そして第2ドメインの阻害部分に対して部分的に配列決定された。この研究は、アミノ酸配列のデータと対照的であり、HI-30がITI軽鎖のカルボキシ末端に存在することを示した。プーアグニオン(Bourguignon)ら、1983参照。

遺伝子クローニング技術を使用すると、HI-

kdの糖蛋白質である。この蛋白質は、構造が、それを蛋白質HCと表示する他の研究者らによって分離された蛋白質に類似する。すべての意図および目的に対して、 $\alpha$ -1-ミクログロブリンおよび蛋白質HCは同一蛋白質から誘導され、そして構造の差はアミノ酸配列の決定方法から生ずるアーチファクトを要すと考えられることができる。蛋白質HCは黄褐色の発色団の基を含有し、そして、シアル酸の炭水化物の残基を酵素ノイラミナーゼで除去した後でさえ、アガロースゲルの電気泳動の伸長質に帯電した蛋白質として移動する。 $\alpha$ -1-ミクログロブリンは、遊離の形態でおよびIgAとの複合体として血漿中に存在する。最近、 $\alpha$ -1-ミクログロブリンは好中性炎症性を促進する上で重要であることが示唆された。HI-30と $\alpha$ -1-ミクログロブリンとの会合は、従来文献中に報告または示唆されてきていない。

本発明は、ITIの軽鎖のHI-30解読領域

(coding region)をもつ配列中の $\alpha$ -1-ミクログロブリンを暗号化する(coding) cDNA配列に関する。また、 $\alpha$ -1-ミクログロブリンとクローニングされたDNA配列から生産されたHI-30との融合蛋白質を開示する。

$\alpha$ -1-ミクログロブリンおよびITIのHI-30部分の遺伝情報を指定することが発見された。この新規な遺伝子の分離に対するアプローチは、特異的の長いオリゴデオキシリボヌクレオチドのプロープを使用して、遺伝子のライブラリーをスクリーニングして、HI-30遺伝子を含む推定上のクローンを同定することであった。これらのプロープは、コドンの偏重が低いHI-30のアミノ酸領域を選択し、そしてこのアミノ酸配列を、最も好ましいヒトコドン、すなわち、ヒト蛋白質の遺伝情報を指定する遺伝子中に最も使用されるコドンを使用して、独特DNA配列に転化(逆翻訳)することによって表示された。

(1)から(1981)によって記載された。すべての順次のステップは、自動化された方法において、アプライド・バイオシステムス380型DNAシンセサイザー(Applied Biosystems Model 380 DNA Synthesizer)で、保護されたヌクレオチド、溶媒、化学物質および試薬を使用して実施し、それらのすべてはアプライド・バイオシステムス(Applied Biosystems)、米国カリフォルニア州フォスター市、から入手した。固相支持体[また、アプライド・バイオシステムス(Applied Biosystems)から入手した]は開孔された孔のガラスであり、これには3'-ヌクレオチドはすでに取付けられていた。製造会社の推奨に従って、ある種の修正を自動化された反応サイクルに導入した。合成が完了したとき、オリゴマーを脱プロテクトし、そして製造会社の推奨に従ってDNA合成装置内で固相の支持体から切り離した。

### 特開昭63-87984 (3)

この設計において利用された蛋白質配列および調製された合成オリゴマーを第1図に記載する。1つのプロープはMet-49からPhe-68までのアミノ酸配列を覆われ、これはHI-30の第1抗原決定ドメインに位置する。他のプロープはアミノ酸Cys-115~Cys132に基づいて設計され、これは第2ドメインに見出された。各プロープは2つの33ヌクレオチド長さのオリゴマーから構成し、これは中央領域において12の相補的オリゴヌクレオチドによって重複されていた。

#### オリゴヌクレオチドのプロープの合成

オリゴヌクレオチドのプロープは、固相合成法[アルキンソン(Aikinson)ら、1984]を使用して調製した。オリゴマーの合成の計画は、プロトン活性化され、保護された2'-デオキシリボヌクレオチドホスホルアミダイト[ベアウケイジ(Beaucage)ら、1981]を利用して、マテウチ(Matlucci

オリゴマーを含む水溶液を過水酸化アンモニウムと一緒に55℃に4~24時間密閉バイアル内で加熱することによって、ブロッキング基の除去を完了した。得られる溶液を蒸発させ、残留物を0.01モルの重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液、pH7.0 (TEAB緩衝液)中に溶解した。この溶液をセファデックス(Sephadex)-G50<sup>®</sup>ゲルろ過樹脂のクロマトグラフにかけた。このカラムは同一のTEAB緩衝液中で調製し、かつその緩衝液で洗脱した。空腔体積で溶離する物質をプールし、そして溶液を蒸発した。残留物の一部(260nmにおける吸収率の10~40%)を炭素緩衝液(組成: 0.1%のプロモフェノールブルー、0.1%のキシレンシアノール、10ミリモルのEDTA二ナトリウム、ホルムアミド中)中に溶解し、さらにポリアクリルアミドのゲル上の電気泳動によって精製した。ゲルの大きさは18×32cm、厚さ1.5mmであった。この方法において

## 特開昭63-087984(4)

精製した各オリゴマーのためのウェル (well) の大きさは幅2~5cmであり、そして5種類までのオリゴマーを単一のゲルで精製した。ゲル中のアクリルアミドの濃度は、所望生成物の鎖長に依存して、14~20%で変化した。より長いオリゴマーについて、14%のゲルは好ましいが、より短いオリゴマーは20%までのアクリルアミドのゲルで精製した。ゲルは、また、7モルの尿素およびトリス-ホウ酸塩-BDTA緩衝液(0.1モルのトリス、0.1モルのホウ酸塩、2ミリモルのBDTA、pH8.3)を含有した。展開緩衝液は同一のトリス-ホウ酸塩-BDTA緩衝液であった。電気泳動は20~60ワットの一定電力において、8~18時間実施した。

電気泳動の完結後、ゲルをプラスチックのラップ内に包み、そしてオリゴマーを紫外線のシャドウイング(shadowing)によって可視化した。このシャドウイングは、ラップしたゲルを

蛍光性薄層クロマトグラフィー板上に置き、そしてゲルを単鎖長の紫外線源で見ることによって達成した。所望生成物は、このシャドウイング技術によって、最も遅く移動する主要なブルーの帯として現れた。所望の帯をゲルから切り取った。DNAオリゴマーをゲルのスプライスから、エビゾン(Epizone) [バルチモア(Baltimore)、米国マリーランド州] D-Gel<sup>®</sup>電気泳動装置を使用して、粉末状ジエチルアミノエチル(DEAE)セルロース上に溶離した。オリゴマーをセルロースから1モルのTEAB緩衝液で溶離して回収した。オリゴマーを含有する緩衝液を蒸発し、残留物を0.01モルのTEAB緩衝液中に溶解し、次いで前述のようにセファデックス(Sephadex)-G50<sup>®</sup>のカラムに通過させて脱塩した。空腔体積中に溶離される物質をプールし、そして凍結乾燥して最終生成物を得た。これらの手順を使用して、約0.5~約5.0A280単位の精製したオリゴマーの各々

を得た。

精製したオリゴヌクレオチドのプロープは、個々のオリゴマーをアニーリングし、そして残留する一本鎖領域中のクレノー断片および放射性ヌクレオチドを次の方法によって充填することによって放射線標識した。オリゴマーを、まず、0.1モルのNaCl中の200μg/mlの濃度でアニーリングした。この混合物を65℃で10分間、37℃で20分間、15℃で20分間および4℃で20分間加熱した。プロープは、大腸菌(E. coli) DNAポリメラーゼIからのクレノー断片および適当な放射性ヌクレオチドを酵素的に充填することによって放射性とした。合成反応混合物は、0.2μgのアニーリングしたオリゴマー、400μモルのdTTP、400μモルのdATP、100μCiのα-P32-dCTP(3000キュリー/ミリモル)、100μCiのα-P32-dGTP(3000キュリー/ミリモル)、50ミリモルのトリス(pH7.

2)、10ミリモルのMgCl<sub>2</sub>、0.01ミリモルのジチオスレイトール、50μg/mlのウシ血清アルブミン、および10単位のクレノー断片から、体積30μlにおいて、成っていた。この反応を23℃で60分間インキュベーションし、次いで標識されないdCTPおよびdGTPに関して400μモルとした。23℃において15分後、反応を1μlの10%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で停止し、そして標識されたオリゴマーをセファデックス(Sephadex)-G50<sup>®</sup>のクロマトグラフィーによって精製した。この方法を用いて、10<sup>6</sup>cpm/μl選伝子の比活性に日常的に到達した。2つの充填したプロープを、ライブラリーの初期のスクリーニングのためのプールした。

## mRNAライブラリーの構成

ヒトmRNAのλgt11cDNAファージライブラリーは、フィンフ(Huyh)ら、1985に記載されているようにして構成した。ライ

## 特開昭63-87984 (5)

ブラリーは $10^6$ の独立のクローンから成り、その包装されたファージの71%はインサートを含む。ライブラリーはベントン (Benton) ら、1977に記載されているようにしてスクリーニングした。

合計 $10^6$ の独立ファージを、宿主大腸菌 (E. coli) 菌株 Y1088 上に375ファージ/ $\text{cm}^2$ の密度でプレATINGした。ブラックのリフト (lift) に使用したニトロセルロースのフィルターを、20%ホルムアミド、2×デンハルトの溶液、5×SSPE (20×SSPEは3.6モルのNaCl、200ミリモルの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.4、203ミリモルのEDTA、pH7.4である)、0.1%のSDS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の剪断した一本鎖のサケ精子DNA中で37℃において少なくとも4時間予備ハイブリダイゼーションした。次いで、リフトしたブラックを含むフィルターを、同一条件下に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の放射線照射した

オリゴマーのプロープ混合物と一夜ハイブリダイゼーションした。プロープ混合物を100℃で10分間インキュベーションした後、フィルターに添加した。フィルターを0.2×SSPE、0.1%のSDS中で37℃において洗浄し、そして-70℃においてデュボン社のハイプラス (Hi-Plus) 増強スクリーニングを使用してコダック (Kodak) XAR-2フィルムに露出した。

これらの方法により、100より多い陽性のクローンが、スクリーニングした426,000ファージにおいて同定された。12の陽性のクローンを選択し、そして単一のファージのブラックの分離によって精製した。これらの個々のクローンを、それらの溶融温度、すなわち、各プロープとの二本鎖プロープ-DNA複合体の熱変性温度を特性づけ、そして挿入されたDNAの大きさを決定することによって分析した。すべての12のクローンは各個々のプロープへハイブリダ

イゼーションした。ドメインIについてのプロープは、0.1×SSPE、0.1%のSDS中で60℃においてクローンの各々へハイブリダイゼーションしてとどまった。ドメインIIについてのプロープは、50℃～60℃において洗浄除去された。インサートの大きさは、同定された組換え体からEcoRI制限エンドヌクレアーゼで除去した後、クローニングした断片のポリアクリルアミドゲルの電気泳動によって決定して、約700～約1300ヌクレオチドの範囲であった。最大のインサートをもつクローンを、DNA配列決定によるそれ以上の分析のために選択した。

DNAの配列決定

ファージのベクター中に挿入されたDNA断片を、制限酵素のEcoRIを使用してベクターから切出した。解放した断片をゲル精製し、そしてデニング (Denning) 、1983の組換え処理技術を用いて、M13ベクター、mp-18中のより小さい断片の不規則ライブラ

リーを発生させるために使用した。個々のM-13クローンを、サンガー (Sanger) ら、1977のジデオキシ鎖終止法 (chain termination method) を使用してDNA配列を決定した。次いで、4つのオリゴデオキシヌクレオチドのプライマーを設計し、そして合成した。これらのプライマーを使用して、不明量のある配列の残る領域を確証した。遺伝子中の各ヌクレオチドを、少なくとも3回その領域を配列決定することによって確認し、そしてヌクレオチドの98%は4回配列決定した。

ショットガンDNA配列決定からのデータを、ゲル・プログラム・オブ・インテリジェネチックス (GEL program of intelligent) を使用して並列した。インターナショナル・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド (International Biotechnologies, Inc.) 、米国コネチカット州ニューヘブーン、から

## 特開昭63-87984 (6)

購入したDNA-蛋白質配列分析ソフトウェアで、オープンリーディングフレームのサーチを実施した。決定されたDNA配列は第2図に示されている。第2図から明らかなように、このクローンのEcoRIは1,232ヌクレオチドの長さである。断片は352アミノ酸のオープンリーディングフレームを含有し、これはヌクレオチド位置51においてメチオニンコドンで開始し、そしてヌクレオチド1108において出発する停止コドンで終る。クローンは、また、3'末端におけるEcoRI部位に隣接して、アデニレート残基の8ヌクレオチドのストレッチ(stretch)を含有する。ポリ(A)付加、AATAA A、のシグナルは、ポリ(A)テイルより上流の19ヌクレオチドに存在する。プローブの構成に使用したオリゴヌクレオチドは、決定したDNA配列と高い相同性を有する。ドメインIのプローブはcDNAと94%の相同性を有し、そしてドメインIIのプローブは91%の相同性を有す

る。これらの高いレベルの相同性は、これらのプローブの部融特性と一致する。

HI-30の完全なアミノ酸配列は、オープンリーディングフレームの3'末端における塩基655~1100の間のヌクレオチドコドンから翻訳することができる。DNA配列によって予測できるHI-30のアミノ酸配列は、ヒトの尿から精製されたHI-30について決定したものとほとんど同一である。2つの位置に小さい差異が存在する。前に発表された蛋白質の配列は、アミノ酸位置86-87にVal-Ileおよび位置138にGluを割当てる。ITI軽鎖についてここで決定したDNA配列は、それぞれ、これらの位置についてIle-ValおよびGlyを割当てる。DNA配列は、ヒト肝臓からのcDNAクローンについて他の研究者らによって前に決定されたものとほとんど同一である。これらの研究者らは、同様なmRNAの最後の264ヌクレオチドのみを報告している【ブーアギノン(Bou

rguignon)ら、1985]。これらの2つの配列の唯一の差異は、3'非翻訳領域における位置1183に存在する、本発明の配列中の余分のシステインである。

オープンリーディングフレームのアミノ末端は、180kdのITIまたはHI-30のいずれでも従来同定されなかった205アミノ酸配列を含有する。この蛋白質配列が他の血清蛋白質のそれと関係することがあるかどうかを決定するために、この配列を使用してナショナル・バイオメディカル・リサーチ・ファンデーション・プロテイン・シーケンス・データベース(National Biomedical Research Foundation Protein Sequence database)をサーチした。このデータベースは、アイファインド・プログラム・オブ・イテリジェネティクス(FIND program of Intellignetics)でサーチした。同一販売会社か

らのアライン・プログラム(ALIGN program)を使用して、陽性の合致の同定後、配列を並列した。この配列は、2つの蛋白質、α-1-ミクログロブリンおよび蛋白質HCの配列とほとんど完全な合致を示した。しかしながら、蛋白質HCの配列はより完全であった。蛋白質HCに関係して、位置55における不一致および位置58および57における2つのアミノ酸ギャップが存在した。この配列はHI-30の第1アミノ酸に隣接してArg-Argジペプチドを欠く3つのアミノ酸で停止する。α-1-ミクログロブリン配列および蛋白質HC配列の両者は、ITI軽鎖のアミノ末端ドメインノ位置Gly-20で開始する。

第3図は、ITI軽鎖の構造を要約する。それはシグナル配列および引続いてα-1-ミクログロブリンの配列を含有する。α-1-ミクログロブリンとHI-30との接合部において、解鎖領域は2つのアルギニン残基である。HI-30の

## 特開昭63-87984(7)

配列はこれらの残基の直後に監視し、そして追加のSer-Asnジペプチドで終る。この蛋白質は42kdの計算分子量を有し、これは大きさがヒト肝臓中で合成されたITI輕鎖に類似する。

## 生体外RNA転写

この新しく発見された蛋白質の構造を立証するために、ITI輕鎖のcDNAクローンからのmRNA転写体を次のようにして合成した。特異的mRNAを調整するために、ストラタジーン・クローニング・システム・インコーポレーテッド(Stratagene Cloning Systems, Inc.) (米国カリフォルニア州サンジエゴ) から購入したブルースクライブ(Bluescribe®) RNA発現ベクターのEcoRI部位の中に、ITI輕鎖のクローンを連結した。この構成物をHindIIIで切断し、次いでクリーグ(Krieg)ら、1984の方法に従いT7 RNAポリメラーゼを使用して生体

外で転写した。これはITI輕鎖DNAインサートのmRNAコピーを生成した。ゲル電気泳動により転写生成物を分析すると、mRNAはDNAの全長のコピーであることが示された。次いで、このmRNA転写体をフェノールで抽出し、そしてエタノールで沈殿させた。翻訳の前に、下を参照(infra)、RNAの転写体をワクシニアウイルスグアニリトランスフェラーゼでキャップした。反応混合物は、50μモルのトリス(pH7.9)、1.25μモルのMgCl<sub>2</sub>、6ミリモルのKCl、2.5ミリモルのジチオスレイトール、100μg/mlのウシ血清アルブミン、100μモルのS-アデノシルメチオニンおよび330μモルのGTPを含有した。ベテスダ・リサーチ・ラボラトリーズ(Bethesda Research Laboratories) から購入した酵素の1単位を、mRNAの1μgにつき使用した。この反応は37℃で45分間実施した。反応をSDSの添加(0.5%)に

により停止し、次いでフェノールの抽出を実施した。

## 生体外翻訳および蛋白質の生成

上の反応において生成したキャップドmRNAを、プロメガ・バイオテック(Promega Bio-tech)、米国ウィスコンシン州マディソン、から購入した、ミクロコックスのスクレアーゼ無阻ウサギ網状赤血球リゼイトの翻訳系中で、対応する蛋白質に翻訳した。翻訳はペルハム(Pelham)ら、1978に記載されるようにして実施した。

次いで、このようにして得られた蛋白質生成物を、α-1-ミクログロブリンおよびインターα-トリプシン阻害剤に対する抗体で対抗させた。これらのウサギ抗体(IgG分画)は、アキュレイト・ケミカル・アンド・サイエンティフィック・コーポレーション(Accurate Chemical and Corporation) (米国ニューヨーク州ウェストバリー) から購入

した。免疫沈殿はドッバーステイン(Dobbostein)ら、1979に記載されるように実施した。免疫沈殿させた生成物は、ラエムリ(Laemmli)、1979に記載されるように実施した。試料を4%のSDSおよび50ミリモルのジチオスレイトール中で10分間沸騰させた後、ゲル上に装入した。これらの実験の結果を図4図に示す。

生体外翻訳生成物は42kdの蛋白質(レーンG)であり、これは新しくクローニングした遺伝子中のオープンリーディングフレームによって予測した大きさと一致した。蛋白質の糖はリゼイト中の同時に移動する蛋白質によってわずかに歪んでいる。新しい蛋白質生成物は、α-1-ミクログロブリンおよび180kdのITI(レーンEおよびF)の両者に対する抗体で沈殿させる。非免疫抗体、抗β-ガラクトシダーゼ抗体によって、あるいは抗体を添加しないとき、有意な量の蛋白質生成物は沈殿しない(それぞれ、レーン

## 特開昭63-87984 (8)

B、C、およびD)。こうして、ITI輕鎖mRNAは、HI-30をもつ $\alpha$ -1-ミクログロブリンのアミノ酸配列を含有する新規な蛋白質を暗号化する。融合蛋白質生成物の両者の領域は、明らかに適切にフォールディングして(fold)エピトープを形成し、これらのエピトープは成熟した31kdの $\alpha$ -1-ミクログロブリンおよびITIの高分子量の形態に対してして作られた特異的抗体によって認識される。

当業者は理解するように、ITI輕鎖のためのcDNAを利用する蛋白質の生成は、また、生体内で達成できる。例えば、ITIの輕鎖のcDNAは、適当なクローニングベクター(すなわち、伝達ベクター)、例えば、ある種のバクテリオファージのDNAのプラスミドの中に組み込むことができる。プラスミドのベクター類は、環状化(circularized)プラスミド構造を働き、次いでDNA配列を前記ベクター中に結合するために適当な種々の制限部位を含有する(あ

るいは、含有するように操作することができる)。バクテリオファージのDNAは、ある種の必須ではないファージ遺伝子の代わりに異型DNAの挿入されたセグメントを有することができる。いずれの場合においても、ベクターは異型配列を宿主中に導入するために手段を提供し、前記ベクターは、また、その中の自己複製の提供に必要な遺伝情報を有する。宿主細胞は、遺伝子の発現に使用される、この分野において現在普通の種々の原核宿主および真核宿主の中から選択できる。このような有機体は、例えば、大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、サッカロミセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの種々の菌種を包含する。さらに、宿主は性質が哺乳動物であることができ、そしてベイビーハムスター(baby hamster)腎細胞、チャイニーズハムスター(*Chinese hamster*)卵巣細胞、ヘラ(Hel

a) およびベロ(VERO)細胞系のような細胞系を包含する。

このような生体内蛋白質の生成は、次のように例示することができる。ITI輕鎖を暗号化するcDNA配列は、ファーマシア・インコーポレーテッド(Pharmacia, Inc.)【モレキュラー・バイオロジカル・カタログ(Molecular Biologicals Catalog)、63ページ、1984】から商業的に入手可能である発現ベクターpKK223-3の独特EcoRI部位の中に連結する。次いで、正しい向きにおけるITI輕鎖のcDNA配列の挿入は、制限プラスミドを生ずる制限マッピング技術によって決定する。次いで、前記プラスミドを使用して、普通の技術によって、大腸菌(*E. coli*)JM105細胞を形質転換する。次いで、形質転換されたバクテリアを生長に適当な条件下に培養する。ITI輕鎖を暗号化するcDNAの発現は、イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトシ

ドを使用する誘導によって達成する。この分野において標準の微生物の処理に引続いて、得られる $\alpha$ -1-ミクログロブリン-HI-30融合蛋白質を分離する。

前述のように、ITIはヒトの血液および血清中に見出されるセリンプロテアーゼ阻害剤である。この蛋白質は、蛋白質分解酵素、トリプシン、キモトリプシンおよび肝中性エステラーゼを阻害することが報告された。治療的観点から、最も重要なプロテナーゼ阻害活性は、ヒトの身体内のいくつかの組織から放出されうる、加水分解酵素エステラーゼの阻害である。ITIは、加水分解酵素の過剰の放出、ことに種々の組織からのエステラーゼから生ずる病気を処理するために治療的に使用できる。例えば、脾臓エステラーゼの過剰の放出は脾臓炎を生ずる。過剰の血清エステラーゼのレベルはアテローム性硬化症に関係づけられてきており、そして過剰の肝中性エステラーゼは、すべての結合組織、血管壁への傷害および腫

## 特開昭63-87984(9)

の組織の壊死および毒性を生ずる急性および慢性の炎症において観察される。免疫学的プロセス、例えば、リウマチ性関節炎のための炎症において、リソソームの酵素、とくに好中性エラスターゼ、が破壊する部分は等しく重要である。

## 引用文献

この明最初中において言及した文献は、次の通りである：

1. アルキンソン (Alkinson) T. ら、「オリゴヌクレオチドの合成—実験のアプローチ (Oligonucleotide Synthesis—A Practical Approach)」, 英国オクスフォード, 1984 (第3章)。
2. ベアウケイジ (Beaucage) S. ら, テトラヘドロン・レターズ (Tet. Lett.) 22, 1859-1862 (1981)。
3. ベントン (Benton) W. ら, サイエンス (Science) 198, 180-182 (1977)。
4. ブーアグニオン (Bourguignon) J. ら, FEBS レターズ (Eur. J. Biochem. Lett.) 162, 279-383 (1983)。
5. ブーアグニオン (Bourguignon) J. ら, バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 131, 1148-1153 (1985)。
6. デイニンガー (Deininger) P., アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 129, 216-223 (1983)。
7. ドッバーステイン (Dobberstein) B. ら, 細胞 (Cell) 17, 759-769 (1979)。
8. ファイン (Huyah) T. ら, DNA クローニング, グロウバー (Glover) D., 編, IRLプレス, 英国オクスフォード (Vol. I, 49-78, 1985)。
9. (Krieg) P. ら, 核酸の研究 (Nucleic Acids Res.) 12, 7035-7056 (1984)。
10. ラエムリ (Laemmli) U. ら, ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ (J. Amer. Chem. Soc.) 103, 3185 (1981)。
11. ペルハム (Pelham) H. ら, ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.) 87, 247-256 (1978)。
12. サンガー (Sanger) F. ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 74, 5463-5467 (1977)。
13. ワッチャー (Wachter) E. ら, ホッペ-セイラーのフュンクツィオネ・フーエル・フィジオロジッシェ・ヘー (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.) 362, 1351-1355 (1981)。
14. 図面の簡単な説明  
第1図は、ITI 種類の cDNA クローンの分離に使用するオリゴヌクレオチドのプロープを示す。

## 特開昭63-87984 (10)

す。プローブの設計に使用する蛋白質配列は、ワッチャー・アンド・ハッチスタッサー (W a c h t e r a n d H a c h s t r a s s e r) 、1981から採用する。ドメインIからの配列は、Met-49~Phe-66、そしてドメインIIからの配列はCys-115~Cys-132である。

第2図は、ITI軽鎖のヌクレオチドおよび蛋白質配列を示す。 $\alpha$ -1-ミクログロブリン ( $\alpha$ -1-ミク) の配列は、ヌクレオチド108で開始し、そしてヌクレオチド856に及ぶ。HI-30はヌクレオチド886で開始し、そしてヌクレオチド1100に及ぶ。ドメインIはヌクレオチド729で開始し、そしてドメインIIはヌクレオチド897で始まる。オリゴヌクレオチドのプローブの設計に使用したアミノ酸配列は、下線を付してある。尿から精製したHI-30の蛋白質配列と異なる位置は、長方形で囲まれている。

第3図は、ITI軽鎖の蛋白質構造を示す。Metはオープンリーディングフレームの第1アミノ酸である。「S」はシグナル配列を示し、そしてAla-Glyは潜在的なシグナルのペプチダーゼ切断部位である。Arg-Argペプチドは、 $\alpha$ -1-ミクログロブリン領域とHI-30領域との境界に存在する。「L」はクニツ (K u n i t z) 様ドメインIおよびIIの前に存在する21アミノ酸配列である。Ser-Asnジペプチドはオープンリーディングフレームの端に存在する。

第4図は、軽鎖mRNAの翻訳生成物の免疫比較を示す。RNAはブルースクライブ (Blue s c r i b e) 発現ベクター中にクローニングされたインサートから転写される。RNAは生体外でキャップ (c a p) され、そして35-Sメチオニンを加えたマイクロソームのヌクレアーゼ処理したウサギ網状赤血球リゼイトで翻訳された。レーンAはRNAを添加しない翻訳であり、

そしてレーンGは軽鎖mRNAの翻訳である。レーンB、C、Dは、非免疫抗体、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼで沈降させ、抗体を含まない、軽鎖RNA翻訳である。レーンEおよびFは、それぞれ、抗 $\alpha$ -1-ミクログロブリンおよび抗インター $\alpha$ -トリプシン阻害剤で沈降させた。

特許出願人 マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平 吉



特開昭63-87984 (11)

FIG.1

例 1  
 Met Ala Cys Glu Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Phe  
 5'-ATG GCC TGC GAG ACC TTC CAG TAC GGC GGC TGC-3'  
 3'-ATG CCG CCG ACG TAC CCG TTG CCG TTC TTG AAG-5'

例 2  
 Cys Gln Gly Asn Gly Asn Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys  
 5'-TGC CAG GGC AAC GGC AAC AAG TTC TAC AGC CAG-3'  
 3'-AAG ATG TCG GTC TTC CTC ACG TCT CTC ATC ACG-5'

FIG. 2 (201)

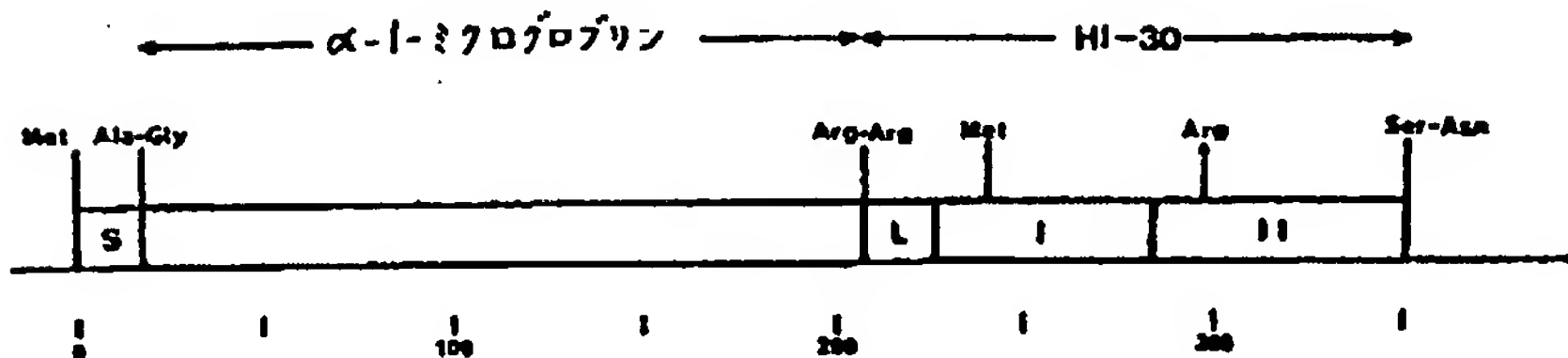
10 20 30 40 50 60  
 AA TTC TAG ACC GAG CCG GTG CGA TAT ACC AAG CCA GAG CCG ACC ATG ACC AGC CTC  
 Met Arg Ser Leu  
 70 80 90 100 110 120  
 CCG CCG CTC CTC TTG GTG ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 130 140 150 160 170 180  
 CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Pro Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 190 200 210 220 230 240  
 TAC AAG CTC GGC ATC CCG TCC ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr  
 250 260 270 280 290 300  
 CCG ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Val Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Glu Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr  
 310 320 330 340 350 360  
 CCG ACC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp  
 370 380 390 400 410 420  
 CCG AAG TTT CTC TAT CAG AAA TCC AAA TCG AAG ATA ACC ATG CAG TCC TAT GTG CTC CAG  
 Gly Lys Phe Leu Tyr Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His  
 430 440 450 460 470 480  
 ACC AAG TAT GAT CAG TAT CCG ATT TTT CTT ACC AAG AAA TTC ACC CCG CAT CAT GGA CCG  
 Thr Asn Tyr Asp Glu Thr Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro  
 490 500 510 520 530 540  
 ACC ATT ACT CCG AAG CTC TAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Cys Tyr Cys Pro Glu Leu Arg Glu Thr Leu Leu Glu Arg  
 550 560 570 580 590 600  
 TTC AGA GTG GTT CCG CAG CCG GTG CCG ATT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
 Phe Arg Val Val Ala Glu Gly Val Gly Ile Pro Glu Arg Ser Ile Phe Thr Thr Met Ala Asp  
 610 620 630 640 650 660  
 CGA GGT CAA TGT GTC CCG CAG CAG CCA CCA CCG ACC ATC TTA ACC CCG AGA GTC CCG  
 Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Glu Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg Val Arg

特開昭63-087984 (12)

FIG. 2 ( \* 2 )

HI-30	660	680	700	710	720
AGG GGT GTC CTA CCC CAA GAG GAA TCA GCG GGT GCG CAA GTC CTA ACT GAA GTC					
ATG Ala Val Leu Leu Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gln Gln Gln Gln Val Thr Gln Val					
740	750	760			
ACC AAG AAA GAA GAT TCC CAG CTG GGC TAC TCG GCG GGT GCG ATG GGA ATG ACC					
Thr Lys Lys Gln Asp Ser Cys Gln Leu Gln Tyr Ser Ala Gln Pro Cys Met Gln Met Thr					
780	800	810	820	830	840
ACC AAG TAT TTC TAT AAT GAT ACA TCC ATG GCG TGT GAG ACT TTC CAG TAC GGC GGC TGC					
Ser Arg Tyr Phe Thr Asn Gln Thr Ser Met Ala Cys Gln Thr Phe Gln Tyr Gln Gln Cys					
860	880	890	900		
ATG GGC AAG GGT AAG AAG TTC GTC ACA GAA AAG GAG TGT CTG CAG ACC TCC CAA ACT GTC					
Met Gln Asn Gln Asn Asn Phe Val Thr Gln Lys Gln Cys Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val					
910	920	930	940	950	960
CGG GGC TGC AAT CTC CCC ATA GTC CGG GGC CCG TCC CAA GGC TTC ATC CAG CTC TCG GCA					
Ala Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gln Pro Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Tyr Ala					
970	980	990	1000	1010	1020
TTT GAT GGT GTC AAG CCG AAG TCC GTC CTC TTG CCG TAC GCG GGC TCC CAG GGC AAG CCG					
Phe Asp Ala Val Lys Gln Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gln Cys Gln Gln Asn Gln					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AAC AAG TTC TAC TCA CAG AAG GAG TCC AGA GAG TAC TCC GGT GTC GGT GAT GAT GAT					
Asn Lys Phe Tyr Ser Gln Lys Gln Cys Arg Gln Tyr Cys Gln Val Pro Gln Asp Gln Asp					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GAG GAG CTG CTG CCG TTC TCC AAG TCA CAA CTG GCG GGT CTG CAA GTC AGA GGA TCG CCA					
Gln Gln Leu Leu Arg Phe Ser Asn					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GTG TGT GTC CCG GCG TGT GGC ACG CAG CCG CAA ACC GCA ACC TGG GTC CAA ATA AAA ACT					
1210	1220	1230			
AAA TTG TAA ACT GGT GAA AAA AAA GGA ATT					

FIG.3



特開昭63-87984 (13)

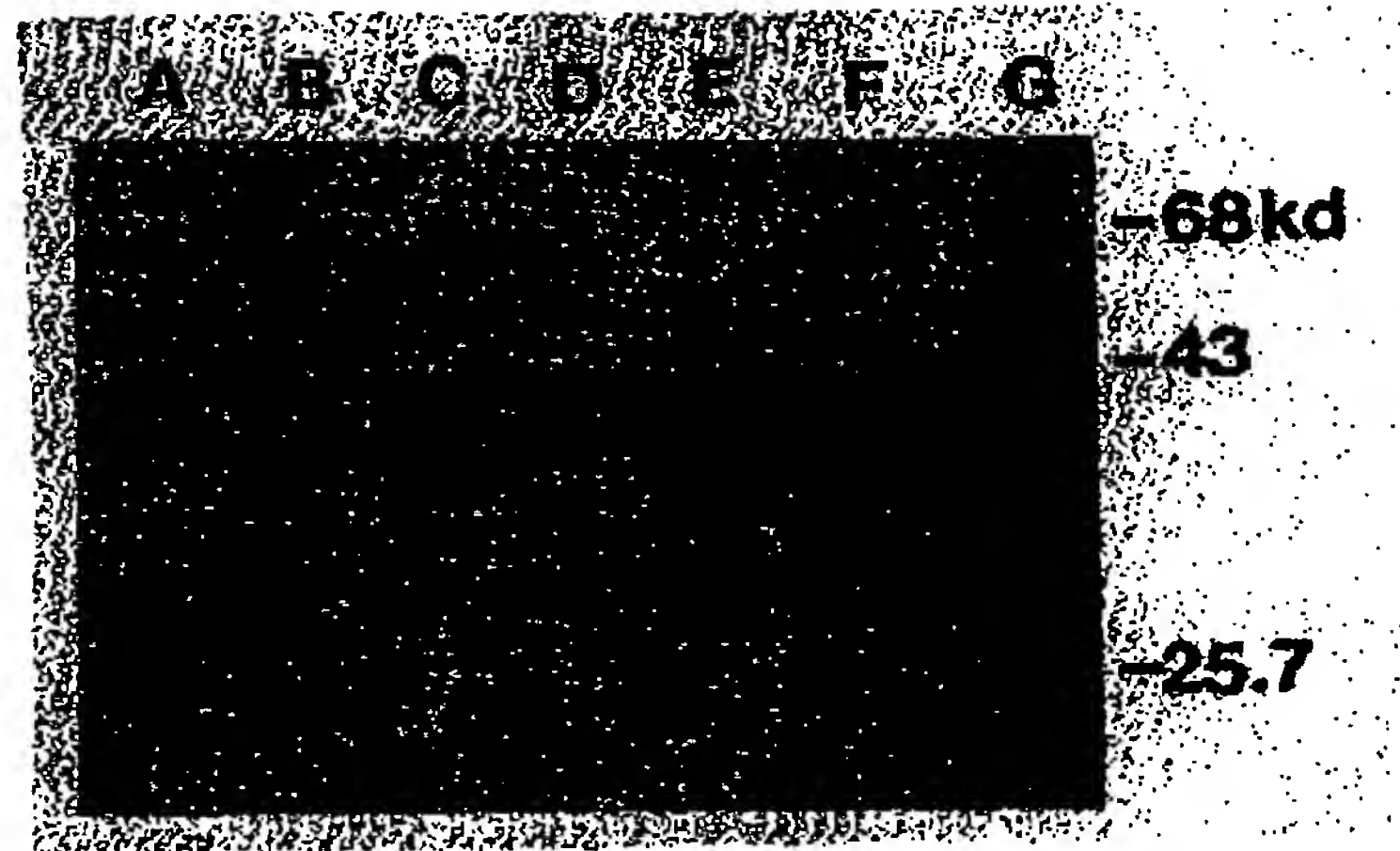


FIG.4

第1頁の続き

④Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号
C 12 N	1/16	K-6712-4B
	1/20	6760-4B
	5/00	6760-4B
C 12 P	21/02	6712-4B
//(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:19)	
(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:125)	
(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:91)	

④発 明 者	ジョセフ・オド・ボラ	アメリカ合衆国インディアナ州46514エルクハート・フォ
	ッジ	レストグローブアベニュー 54226

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**